

Request Form for Translation

Translation Branch
 Field of foreign prior art to you

U. S. Serial No. : 09/866,793

PTO 2003-4030

S.T.I.C. Translations Branch

Requester's Name: PATRICIA DUFFY

Phone No. : 703-305-7555

Fax No. : _____

Office Location: CM-1 8DUS

Art Unit/Org. : 1645

Group Director: Chambers

Is this for Board of Patent Appeals? NO

Equivalent Searching

Foreign Patents

Date of Request: 6/18/03

Date Needed By: 7/18/03

(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

Phone: 308-0881
 Fax: 308-0989
 Location: Crystal Plaza 3/4
 Room 2C01

SPE Signature Required for RUSH:

Document Identification (Select One):

(Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form)

1. Patent Document No. _____
 Language _____
 Country Code _____
 Publication Date _____

2. Article No. of Pages _____ (filled by STIC)
 Author Sakaguchi et al
 Language Japanese
 Country Japan

3. Other Type of Document _____
 Country _____
 Language _____

Document Delivery (Select Preference): E-Office
 _____ Delivery to nearest EIC/Office Date: 7-1-03 (STIC Only)
 _____ Call for Pick-up Date: _____ (STIC Only)
 _____ Fax Back Date: _____ (STIC Only)

To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

Will you accept an English Language Equivalent?

NO (Yes/No)

Will you accept an English abstract?

NO (Yes/No)

Would you like a consultation with a translator to review the document prior to having a complete written translation?

NO (Yes/No)

STIC USE ONLY

Copy/Search
 Processor: _____
 Date assigned: _____
 Date filled: _____
 Equivalent found: _____ (Yes/No)

Translation
 Date logged in: 6-19-03
 PTO estimated words: 3000
 Number of pages: 17
 In-House Translation Available: _____

Doc. No.: _____
 Country: _____

In-House:
 Translator: _____
 Assigned: _____
 Returned: _____

Contractor:
 Name: F/S
 Priority: E
 Sent: 6-19-03
 Returned: 7-2-03

Remarks: _____

RECEIVED
 2003 JUN 18 PM 2:22
 TRANSLATIONS DIVISION
 USPTO SCIENTIFIC LIBRARY

**THE BRITISH LIBRARY D.S.C.
FAX TRANSMISSION IN RESPONSE TO
A COPYRIGHT FEE PAID REQUEST**

COPYRIGHT: OUR LICENCE EFFECTIVELY RESTRICTS FAX TO PAPER TO PAPER DELIVERY. VIEWING THIS DOCUMENT ON A SCREEN OR CONTINUING TO STORE IT ELECTRONICALLY AFTER THE RECEIPT OF A SATISFACTORY PAPER COPY, IS NOT PERMITTED.



*This document has been supplied by
The British Library Document Supply Centre,
on behalf of*

Chemical Abstracts Service.

*Warning: Further copying of this document
(including storage in any medium by electronic means),
other than that allowed under the copyright law, is not
permitted without the permission of the copyright
owner or an authorized licensing body.*



CAS Document Detective Service
2540 Olentangy River Road
P.O. Box 3012
Columbus, OH 43210-0012

Jpn. J. Med. Mycol.
Vol. 25, 219-224, 1984
ISSN 0583-0516

PTO 2003-4030

S.T.I.C. Translations Branch

アスペルギルス感染における溶血毒素の役割と生物活性

坂口 平 横田 勝司 蝦名 敬一 石塚 幸雄

東北薬科大学第1衛生化学教室

Aspergillus fumigatus のマウスでの実験的感染で、感染経過中での各臓器、組織内での生菌の消長は、肝、脾、肺臓内では急速に減少するが、 10^7 個生菌投与群で10日後でわずかであるが生存が見られたのは腎と脳であつた。また酵素抗体法で実際に溶血毒(Asp-hemolysin)の産生と分泌が証明された。溶血毒は感染を促進し、毒素抗体ではIgGがIgMより強く感染を抑制した。

溶血毒投与マウスの病理組織学的所見では、腎、肝、心、脳に毒素による病変が認められた。毒素はヒト白血球やモルモット腹腔Mφの形態学的変化を示した。

真菌症の発生機序で、近年増加の傾向を示す続発性内臓真菌症では、宿主側要因が大きく関係することは多くの研究者により指摘されているが、その多くは感染防御能が著るしく減退している宿主に発生することが認められている^{1,2)}。一方菌側要因としての細菌毒素の病因的意義については毒素が自然感染の全経過においてどのような役割を有するかが重要な課題であるが、多くの研究者の努力にもかかわらず、今日なお不明に残されているものも多い。病原真菌毒素については僅かに岩田らが *Candida albicans* のカンジトキシン³⁾、*Aspergillus fumigatus* からの致死と毒性を示すフミガトキシンの単離を述べているにすぎない⁴⁾。 *A. fumigatus* で部分精製であるが Henrici⁵⁾ や Tildenら^{6,7)} の致死、溶血、皮膚壊死性を示す報告があつたが、その後行なわれていない。

われわれは今日まで *A. fumigatus* の毒素産生およびその分離と精製を行ない、溶血性と致死性を示す真菌毒素として分子量約30,000のものを得て Asp-hemolysin と命名⁸⁾ し、この毒素の物理、化学的性状と生物学的性状⁹⁾ の特性について逐次報告してきた。

Sabouraud 培地で静置培養した培養濾液および菌体 homogenate の遠心上清を67%硫酸飽和沈澱した粗画分は致死、溶血性の他に collagenase, caseinase など proteinase 活性を示す皮膚壊死および出血性などの生物活性を示した。しかし DEAE-Sephadex や Sephadex G-100 および同 G-150 カラムクロマトグラ

フィーでの精製過程で、致死性と溶血性のみを示す毒素(Asp-hemolysin)が得られ、今日までのいろいろな研究から、溶血活性の中心はチオール基であり、その溶血毒産生は *A. fumigatus* でも菌株で大きな差があり、また赤血球に対する溶血性には大きな動物種差があつた⁹⁾。

今回マウスでの実験的 *Aspergillus* 感染症で、実際に生体内でもこの溶血毒素が産生されるか否か、またこの毒素の実験的感染症促進性の有無、生体臓器、組織内分布や障害性について実験した結果を述べたい。

1. 実験的マウス感染における Asp-hemolysin の投与の影響

a) 臓器・組織内菌分布とその消長：*A. fumigatus* 生菌 spore を ddY マウス静脈内に0.2 ml あたり 10^7 個と 5×10^6 個を静注して、その死亡率を見た結果は、 10^7 個では3日より死亡しはじめて接種1週間以内に1群10匹の全てが死亡し、 5×10^6 個では3週間後でも約20%のマウスが生残つた。そこで 5×10^6 個生菌接種マウスでの経時的各臓器別生菌数の消長と分布変動を観察したのが Table 1 である。特に肝、肺、脾臓の網内系臓器内の増減が特に著るしいのは一般病原細菌の感染の場合と同様の傾向であるが、10日後は脳と腎臓の他は生菌の培養試験は陰性化している。この点は岩田らのカンジダ属真菌による実験的感染の報告とも一致する傾向が見られた^{10,11)}。

b) 毒素の感染促進効果と抗毒素抗体への効果：毒素を生菌と同時に投与した時の致死効果を Fig. 1 に示した。毒素は1 μ g と10 μ g 投与で行つた。その結果は 5×10^6 個の生菌と毒素をマウス尾静脈に同時投与

別刷請求先：坂口 平

〒983 仙台市小松島4-4-1
東北薬科大学第1衛生化学教室

Table 1. Fungal population in organs of mice after inoculation with 5×10^6 viable spores of *A. fumigatus*.

Organ	Mouse no.	Time after inoculation					
		4 hrs	24 hrs	3 days	4 days	7 days	10 days
Lung	1	112,500	1,800	0	0	0	0
	2	90,000	1,350	0	300	0	0
Liver	1	3,510,000	247,300	18,000	19,800	0	0
	2	3,160,000	189,000	36,000	27,000	18,000	0
Spleen	1	151,500	12,900	3,150	3,750	300	0
	2	180,500	18,000	4,500	6,000	0	0
Brain	1	2,400	0	600	750	0	0
	2	3,600	600	8,400	34,200	0	500
Heart	1	6,700	280	450	150	0	0
	2	5,200	1,050	4,800	1,500	0	0
Kidney	1	16,000	1,200	2,000	450	750	300
	2	28,200	4,800	7,800	35,250	1,120	0

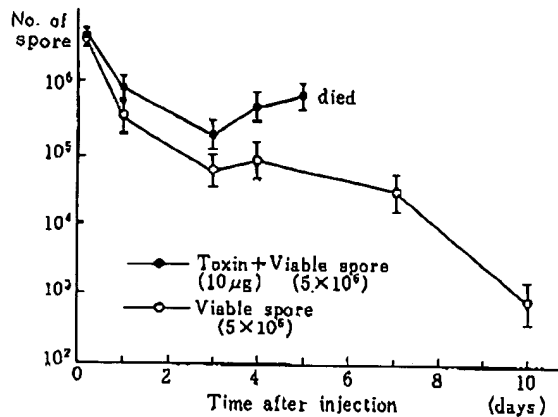


Fig. 1. Fungal population in mice after simultaneous injection of Asp-hemolysin and viable spores.

すると、生菌のみでは5日以後20%の生残りを示したが、1または10 μg 毒素の同時併用投与では5日までに全例が死亡し、毒素の感染促進効果が見られた。しかしながら *A. fumigatus* の溶血毒の産生は、菌株差が著しいことはさきにわれわれの報告したごとくであり、実際の臨床例での感染に果たす役割はなお不明のものがある¹²⁾。

溶血毒をウサギに投与して作製した抗毒素血清を硫酸1/2飽和沈澱し、DEAE-セルローズカラムクロマトグラフィーで精製して得たIgG, IgM, IgAの各精製抗体を、マウスの腹腔内に投与し、その生残率を見た結果は、IgG抗体投与群では100 μg で50%、500 μg で全例(100%)の生残率を示し、他の抗体よりは高い生残

率を示した。これはフミガトキシンに対して、IgM抗体が中和能力を担っている報告とは異なっている¹²⁾。

c) 生菌接種または毒素投与とマウスの生体内臓器・組織内分布：溶血毒が *in vivo* で実際に体内臓器・組織内で *A. fumigatus* 実験的感染時に産生されるか否かを間接酵素抗体法で追求した。その方法はIgG抗毒素抗体にパーオキシダーゼを結合せしめ、0.04% 4-クロール-1-ナフトールと H_2O_2 で発色せしめる方法である。

感染経過中に各組織より菌体とその産生する溶血毒の検出を試みたが、実際に青色に染る毒素を検出し得た臓器・組織は腎臓と脳であつた。尾静脈内に 10^7 個の生菌接種で、2日後のマウスの腎皮質および大脳で菌体周辺に毒素の産生分泌が検出された。 5×10^6 個の生菌接種2週間後まで生残したマウスの腎臓には、糸球体内と一部尿管中で菌体周辺に青色に染まる毒素の存在が確認された (Fig. 2)。この結果は岩田ら¹¹⁾ の実験的真菌感染症で、*A. fumigatus* は腎臓と脳が最も好適な増殖臓器・組織であつたとの報告と同様な傾向を示した。

以上のように間接酵素抗体法によつて、感染生体内で実際にこの溶血毒素が産生分泌されることが証明された。

2. Asp-hemolysin 投与マウスの病理組織学的所見

溶血毒素投与によるマウス生体内臓器、組織の病理所見を求めた。

精製した溶血毒¹³⁾ 13 μg を雄性 ddY マウス 4 週齢

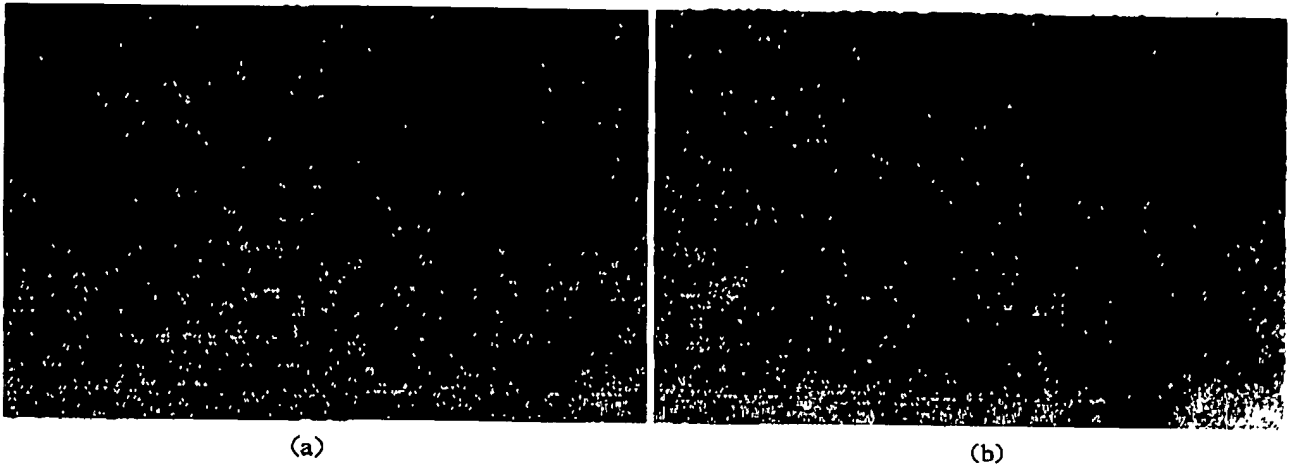


Fig. 2. Evidence of Asp-hemolysin production in mouse tissues by enzyme-labeled antibody method. : kidney (a) and cerebrum (b) 2 days after challenge of 1×10^7 viable spores. $\times 600$.

(20 ± 1 g)の尾静脈内に投与し、6、12時間、1、2、4、7日後の経時的変化を、頸部切断による脱血後の脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓などの別出臓器について、常法のように Bouin 液固定、パラフィン包埋後の標本切片について、ヘマトキシリン・エオジン (H. E)、PAS 染色した結果を Fig. 3 に示した。

腎臓では投与後6時間より7日間にわたり病変が見られ、亜急性ピマン性糸球体腎炎に特長的な Bowman 嚢上皮の増殖、肥厚による半月体形成が見られ、この変化は6時間後より、2日後が高度であった。

心臓での所見は、注射後12時間経過後のものを示した。心筋細胞のエオジンが濃染する筋形質 sarcoplasm の均質化と塊状化が見られた。特に細動脈周辺の病変が顕著で、組織変性と壊死が見られた。

肝臓では肝小葉の中心静脈を中心に放射状に配列する肝細胞板の細胞浸潤巣、壊死、核の濃縮、崩壊などが見られた。

脳では菌の発育が見られるのはさきにも述べたが、病理所見として小脳白質の毛細血管からの出血巣が見られた。

3. 溶血毒投与マウスの免疫組織化学的所見.

溶血毒 $13 \mu\text{g}$ をマウス尾静脈内投与した後、各臓器・組織での毒素の分布をパーオキシダーゼ間接酵素抗体 (antihemolysin IgG) 法で検出を試みたのであるが、検出し得たのは各臓器組織中で腎臓と脳のみであった。腎臓髓質にみられた小葉間動脈で、内弾性板と外弾性板の間の中膜に局在した毒素が認められた。脳の脳底動脈枝でも動脈壁中膜に、また脳軟膜にも検出

された。

4. 溶血毒の血管壁透過性亢進作用

溶血毒を $25-100 \mu\text{g}$ の各濃度でマウス腹腔内に投与し、次いで 2.5% トリパンプルー (TB) 0.2 ml を尾静脈に投与後、腹腔内に漏出した TB 色素を吸光度 590 nm で測定した。その結果は、腹腔内に漏出した TB 量は直線的に毒素投与量に応じて増大した。次に溶血毒を皮下投与し、TB を静脈内注射した後の血管透過性の亢進を青色斑点スポットを測定した結果、同様に dose response が見られた。

この血管透過性亢進作用に毒素が chemical mediator を介しているか否かを、以下の薬剤投与で行なった。

レセルピン (1 mg/kg 5日間マウス腹腔内に投与前処理した後、毒素を投与する)。

ジフェンヒドラミン (50 mg/kg を毒素投与の30分前にマウス腹腔内に投与)。

インドメタシン (毒素投与前 5 mg/kg を皮下注射する)。

コーチゾン (毒素投与前 5 mg/kg を皮下注射)。

これらについて TB の漏出と皮膚青色スポットの測定を行なった。その結果はレセルピン投与で血管透過性亢進は約 25% 抑制された。ジフェンヒドラミンは抗ヒスタミン作用と抗コリン作用を有するが、透過性は約 40% 抑制された。コーチゾン投与によつては透過性は約 30% 抑制され、膜の安定化が見られた。しかるにプロスタグランジン合成阻害剤であるインドメタシン投与によつては抑制効果は見られなかつた。

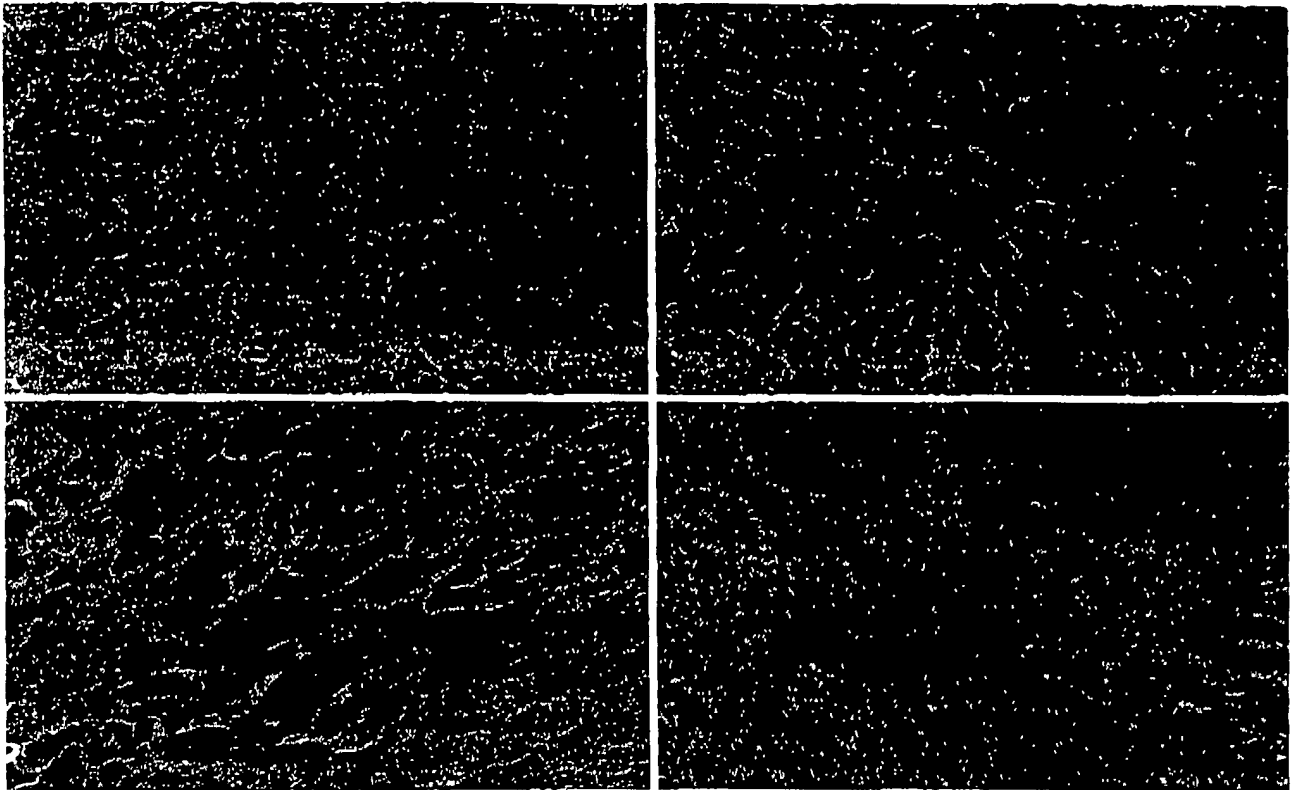


Fig. 3. Histopathological findings of the kidney (a), heart (b), liver (c) and brain (d). 12 hours after injection of Asp-hemolysin. Hematoxylin and eosin stain. $\times 400$

- (a) Thickening and increasing of epithelial cells of Bowman's capsule.
- (b) Degeneration and necrosis of cardiac muscle fibers in myocardium.
- (c) Necrosis of liver cells with pyknosis around central vein of lobule.
- (d) Focal lesion of hemorrhage in white matter of the cerebellum.

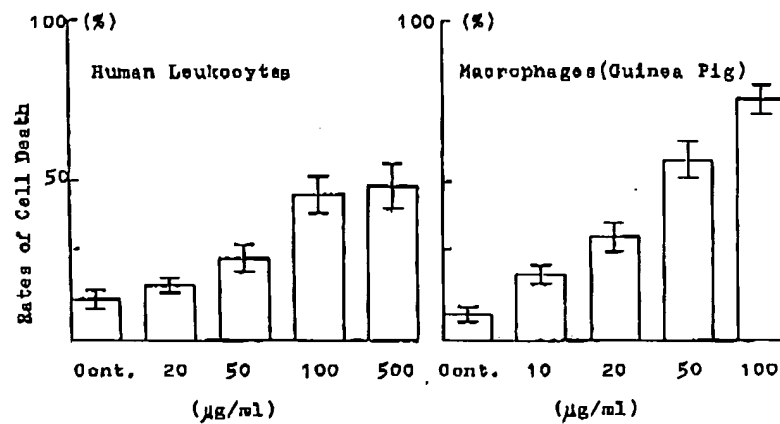


Fig. 4. Effect of Asp-hemolysin on the phagocyte. Each vertical bar represents means \pm S.E. of 3 preparations.

以上の結果から、この溶血毒素はヒスタミンなどの mediator またはそれ自体のヒスタミン様作用で、或いは血管膜不安定化作用で透過性の亢進をおこしたものと考えられる。

5. 溶血毒のモルモット摘出腸管収縮に及ぼす作用

モルモット摘出腸管に対する作用として、アセチルコリン 10^{-7} g/ml による回腸の収縮作用を 100 とし、溶血毒の各濃度における収縮力を測定した。10 μ g/ml で約 30% の収縮率の抑制があつた。20—50 μ g/ml では 70—100% で、この収縮はアセチルコリンの約 1/3 の強度であり、収縮作用は岩田ら¹⁴⁾のカンジトキシンの腸管収縮力の約 10 倍であるが、反応発現が遅く、洗滌しても容易に除けないので結合するものと考えられる。

抗コリン作用、抗ヒスタミン作用のあるジフェンヒドรามミン前処理の影響は、その濃度増加にともない毒素による収縮率が低下する傾向が見られた。

6. 多形核白血球 (PMN) および腹腔マクロ

ファージ (M ϕ) に対する細胞毒性

PMN および M ϕ に対する溶血毒の影響を試みた結果を Fig. 4 に示した。この細胞毒性試験の為に、一定量の PMN および M ϕ 浮遊液に対して、各濃度の毒素溶液を添加し、1 時間、37°C で反応させた後、0.25% トリパンブルーで染色し、光学顕微鏡下、改良型 Neubauer 計算板で全細胞中の死細胞の割合を求めた。M ϕ はモルモットに流動パラフィンを注入後、4 日目に脱血後の腹腔より採取し、20% 牛胎児非動化血清を含むイーグル MEM 液で 10^7 個/ml として使用した。

その結果は PMN では毒素 100 μ g/ml で、1 時間、37°C で反応後に 0.25% TB 染色で顕微鏡下で測定するに、約 40% が死滅し、M ϕ では 10 μ g/ml から細胞毒性が見られ、 1×10^6 個の約 50%、100 μ g/ml では約 70% の細胞の死滅が見られ、PMN、M ϕ ともに細胞の膨潤、核の分散などが観察し得た。

考 察

実験的 aspergillosis には、あらかじめ宿主の感染防御能を低下させる目的でステロイド剤などの前処理を行なっている報告が多い^{15,16)}。著者らはかかる前処理なしに、マウスの尾静脈内に菌を接種して、菌数 1×10^7 個の接種では 7 日間に定型的に感染して全量の死亡を見たが、 1×10^6 個では 3 週間後で 80% の死亡率を示した。接種後の感染経過中の菌の変動は、網内系臓器に著るしいが、特に腎臓と脳において最も親和性

を示すことは岩田ら¹⁴⁾の報告と一致した。しかも酵素抗体法での免疫組織学的手法による検出法で、溶血毒が実験的にも脳や腎で菌の周辺部に分泌されていることが証明された。またカンジトキシソとフミガトキシソについては IgG よりも IgM 抗体の方が感染防御作用を示すが¹⁴⁾、この溶血毒は IgG 抗体の方が防御力が大きかつた。

この溶血毒がまた *A. fumigatus* 感染を促進することも認められ、virulence factor としての一役を担うことも示唆された。また単離、精製した Asp-hemolysin をマウスの腹腔内に 13 μ g 投与し、その後のマウス臓器・組織の病理学的検査と毒素の酵素抗体法による検出を試みた。その結果は腎臓 Bowman 嚢の半月体形成などは、著者ら¹⁷⁾がすでに報告した粗毒素 (皮膚壊死活性を含む) による結果とはほぼ同様であつた。心、肝臓では血管周囲の実質細胞の変性、壊死が認められ、特に血管には中膜に局在して毒素が検出された。

生体アミンの潤滑剤のレセルピンや抗ヒスタミン作用を有するジフェンヒドรามミン、細胞膜保護作用をもつコーチゾンなどで毒素による透過性亢進の抑制が若干認められた。毒素による食細胞の形態的变化も観察され¹⁸⁾、これらは *C. albicans* と若干異なる成績であつたのは、菌種による細胞内殺菌システムに若干異なる所を有すると考えるが、今後の研究にまちたい。

終りに、御教示をうけた東北大学医学部病理学第 2 講座の笹野伸昭教授に深謝致します。

文 献

- 1) 久米 光, 奥平雅彦: 内臓真菌症の病理と免疫, 日本臨床, 38: 4289—4294, 1980.
- 2) 菊地雅夫: 肺炎型アスペルギルス症. 日本臨床, 38: 4337—4342, 1980.
- 3) 岩田和夫: 真菌毒素. タンパク毒素-上 (村田, 逢坂, 大橋編) p. 547—565. 講談社サイエンティフィック, 東京, 1972.
- 4) 岩田和夫, 松田 明, 若林清重, 福永 昇: *Aspergillus fumigatus* の産生する内毒素様物質について (予報). 真菌誌, 3: 66—73, 1962.
- 5) Henrici, A.T.: An endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. J. Immunol., 36: 319—338, 1939.
- 6) Tilden, E.B., Freeman, S. and Lombard, L.: Further studies of the *Aspergillus* endotoxins. Mycopathol. Mycol. Appl., 20: 253—271, 1963.
- 7) Tilden, E.B., Harton, E.H., Freeman, S., Williamson, W.M. and Koenig, V.L.: Preparation and properties of the endotoxins of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*.

- Mycopathol. Mycol. Appl., 14 : 325—346, 1961.
- 8) Yokota, K., Shimada, H., Kamaguchi, A. and Sakaguchi, O.: Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus*. VII. Purification and some properties of hemolytic toxin (Asp-hemolysin) from culture filtrates and mycelia. Microbiol. Immunol., 21 : 11—23, 1977.
 - 9) 坂口 平, 横田勝司, 鎌口有秀: *Aspergillus* 毒素の研究. VIII. Asp-hemolysin の生物学的性状. 日細菌誌, 32 : 821—828, 1977.
 - 10) 岩田和夫, 良井辰夫: 実験的真菌感染における方法論の検討. 第1報. 接種菌量と毒力との関係. 真菌誌, 12 : 13—16, 1971.
 - 11) 岩田和夫, 良井辰夫: 実験的真菌感染における方法論の検討. 第2報. 臓器内菌分布から見た毒力の比較. 真菌誌, 12 : 157—167, 1971.
 - 12) 鎌口有秀, 横田勝司, 坂口 平: *Aspergillus fumigatus* 毒素の研究. (9)真菌間にみられる生物活性の相違について. 真菌誌, 18 : 225—231, 1977.
 - 13) 岩田和夫: 真菌毒素とその病因学的意義. 真菌誌, 18 : 279—298, 1977.
 - 14) 岩田和夫: 真菌毒素に関する最近の知見, とくに高分子毒素を中心として. 日細菌誌, 27 : 563—576, 1972.
 - 15) White, L.C.: Germination of *Aspergillus fumigatus* conidia in the lungs of normal and cortisone-treated mice. Sabouraudia, 15 : 37—41, 1977.
 - 16) Sandhu, D., Sandhu, R.S., Odmodarar, V.N. and Randhaua, H.S.: Effect of cortisone on bronchopulmonary aspergillosis in mice exposed to spores of various *Aspergillus* species. Sabouraudia, 8 : 32—38, 1970.
 - 17) 坂口 平, 横田勝司, 今本喜久子: *Aspergillus fumigatus* 毒素の研究. 第4報. 毒素のトキシド化と毒素注射マウスの病理組織学的, 臨床化学所見. 真菌誌, 14 : 7—12, 1973.
 - 18) Arai, T., Mikami, Y. and Yokoyama, K.: Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils. Sabouraudia, 15 : 171—177, 1977.

A Role of Hemolytic Toxin and its Biological Activity During Experimental *Aspergillus* Infection in Mice

Osamu Sakaguchi, Katsushi Yokota, Keiichi Ebina and Yukio Ishizuka

First Department of Hygienic Chemistry, Tohoku College of Pharmacy, Sendai, Miyagi 983, Japan

The experimental injection of *Aspergillus fumigatus* in mice was examined by intravenous inoculation at doses of 5×10^6 and 10^7 viable spores. The viable organisms were detected in the kidney and brain ten days after challenge and secretion of Asp-hemolysin from the mycelia was actually observed immunohistochemically in the tissues using a technique of indirect enzyme labeled antibody (peroxidase binding IgG antibody).

With the simultaneous administration of Asp-hemolysin and the organism, the toxin was shown to be a virulent factor in *A. fumigatus* infection. On the other hand, pretreatment with antitoxin IgG-antibody exhibited greater protective effect against *A. fumigatus* invasion than did IgM antibody.

In histopathological aspects, lesions of various degrees were observed in the kidney, heart, liver and brain of mice injected with the hemolytic toxin from *A. fumigatus*. The toxin was definitely bound to arterial walls in the kidney and brain. Intraperitoneal injection caused an increase in capillary permeability, and the toxin showed higher cytotoxicity to human leukocytes and guinea pig alveolar macrophages *in vitro*.

INTER LIBRARY LOAN REQUEST FORM

NO 4110

Borrower's Name Org or A.U. Phone
 Serial Number Req. Date Date

Please Attach Copy of Abstract, Citation, or bibliography, If Available. Please Provide Complete Citation. Only One Request Per Form

450661

Author/ Editor:	Sakaguchi et al.
Journal/Book Title:	Japanese Journal of Medical Mycology
Article Title:	
Volume (Issue):	25(3)
Pages:	219-224
Year of Publication:	1984
Publisher:	
Remarks:	Get Translation

STIC Use Only

Accession Number: _____

Library Action	LC		NAL		NIH		NLM		NBS		PTO		OTHER	
	1s t	2nd	1s t	2nd	1s t	2n d	1s t	2n d	1s t	2nd	1s t	2nd	1s t	2nd
Local Attempts														
Date														
Initials		<i>[Signature]</i>												
Results														
Examiner Called														
Page Count														
Money Spent														

Provided By: Source and Date

Ordered From: Source and Date

Remarks/Comments

1st & 2nd dnotes time taken to a library

O/N - Under NLM means Overnight Service

FX - means Faxed to us